Aus dem Institut für Pharmakologie
und experimentelle Therapie der Universität Breslau.

Über ein neues wasserlösliches Digitalispräparat.

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Würde eines Doktors der Zahnheilkunde

bei der

Hohen Medizinischen Fakultät
der Schlesischen Friedrich-Wilhelms-Universität zu Breslau

vorgelegt von

Johanna Becher
Zahnärztin.

Breslau 1933.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Breslau.

I. Referent: Professor Dr. Hesse.

II. Referent: Professor Dr. Riesser.

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Obwohl den galenischen Digitalispräparaten, vor allem dem Infus, wegen der beschränkten Haltbarkeit und der Unmöglichkeit einer parenteralen Anwendung gewisse Nachteile anhaften, scheint die Praxis solche Zubereitungen nicht entbehren zu können. Es liegt die Vermutung nahe, daß mit den galenischen Produkten aus Digitalisblättern im Durchschnitt bessere therapeutische Erfolge erzielt werden als mit den nach besonderen Verfahren hergestellten Fabrikaten. Ob diese Einstellung berechtigt ist und ausreichend begründet werden kann, soll hier nicht untersucht werden. Jedenfalls hat sich die ausschließliche Verwendung reiner Glykoside, z. B. die des stark kumulierend wirkenden Digitoxins oder des schwächer wirksamen Gitalins in der Praxis nicht allgemein durchsetzen können.

Da dem Zusammenwirken der verschiedenen Glykosidfraktionen in den Blättern eine besondere Rolle für die therapeutische Wirkung zugesprochen wird, hat man sich bemüht, Präparate aus der Droge zu gewinnen, in denen sämtliche herzaktiven Glykoside verhanden sind. Viele von ihnen enthalten zweifellos die Hauptbestandteile der Digitalisblätter, also das Digitoxin, Bigitalin (Gitoxin — WINDAUS), Gitalin und deren Genine. Doch sind keine zuverlässigen Belege dafür bekanntgeworden, daß die Handelspräparate die gleiche prozentuale Glykosidmischung besitzen wie die Blätter und so dem Ideal eines ballastfreien, stabilen, oral wie parenteral anwendbaren Infuses nahekommen.

Solange geeignete chemische Methoden zur quantitativen Trennung der einzelnen Glykosidfraktionen fehlen, wird man auf biologische Wertbestimmungen am Frosch, Meerschweinchen oder an der Katze angewiesen sein und wird unter Berücksichtigung der Streuungsbreite derartiger Verfahren nur dann mit derselben Zusammensetzung vom Ausgangs-

material und Endprodukt rechnen dürfen, wenn die Ausbeute an herzaktiven Stoffen sehr hoch und ihre Kumulativwirkung die gleiche ist. Ferner ist zu verlangen, daß durch das Extraktionsverfahren eine Zersetzung der Inhaltsstoffe der Droge vermieden wird und die Wasserlöslichkeit des Endproduktes erhalten bleibt. Denn auch im Infus liegen die Glykoside in Wasser gelöst vor.

Bei dem Versuch, Präparate aus Digitalisblättern zu gewinnen, die den obengenannten Bedingungen entsprechen, begegnet man zunächst der Schwierigkeit, das Pflanzenmaterial vom Chlorophyll und den Fetten zu befreien, ohne Aktivstoffe zu verlieren. Eine Vorbehandlung mit Petroläther, wie sie kürzlich von STASIAK und ZBORAY[1] angegeben worden ist, führt zwar, wie wir bestätigen können, nicht zu einem Verlust an herzwirksamer Substanz, aber dieses Lösungsmittel entzieht den Blättern nur langsam und unvollkommen den Blattfarbstoff. Geeigneter ist das Benzol. Wir bestimmten den Wirkungswert der Droge vor und nach der Extraktion mit Benzol nach dem Verfahren von HOUGTHON-STRAUB an Fröschen, entsprechend der amtlichen Vorschrift über die Prüfung von Fingerhutblättern[2].

Nach mehrstündiger Extraktion mit Benzol im Soxhlet gewinnt man bräunlich gefärbte, fettfreie Blätterpulver, deren Wirkungswert gegenüber dem Ausgangsmaterial kaum verändert ist. So fanden wir in einigen Versuchen nach einer bis zu 100 Stunden langen Einwirkung von Benzol eine Abnahme der F. D. um 9%. Da die Fehlergrenze der Auswertung am Frosch $\pm$ 25% beträgt, bedeutet diese geringe Abnahme praktisch keinen Verlust an Aktivstoffen.

Tabelle 1. Bestimmung der F. D. von Folia Digitalis vor und nach einer Extraktion mit Benzol im Soxhlet.

Blätterpulver	F.D. pro g Folia vor der Benzolbehandlung	Extraktionsdauer mit Benzol im Soxhlet in Std.	F.D. pro g Folia nach der Benzolbehandlung
Folia Digitalis, Caesar & Loretz 1932	960	100	1000
Folia Digitalis titrata, Caesar & Loretz 1932	1840	4	1670
		24	1670
		72	1670

Zur Extraktion der Glykoside verwendeten wir organische Lösungsmittel und trennten mit geeigneten Entmischungsverfahren die Aktivstoffe ab. Dazu wurden die Glykoside aus der mit Benzol vorbehandelten Droge mit 95proz. Alkohol ausgezogen. Die gewonnene Lösung wurde dann nach Zugabe von aromatischen Kohlenwasserstoffen, z. B. Benzol mit Wasser, entmischt, wobei die Benzolphase den Rest der färbenden Substanzen aufnimmt. Zur weiteren Reinigung dient die Extraktion der wäßrig-alkoholischen Lösung nach passender Konzentrierung mit Chloroform und Fällung der Glykoside mit Petroläther in bekannter Weise. Die so er-

haltenen Substanzgemische fallen in ziemlich konstanter Ausbeute an, sind hellgelb, bis ganz leicht grünlich gefärbt und nicht hygroskopisch. Ihr Aschengehalt beträgt etwa 0,8—1,2%. Sie lösen sich nach mehrstündigem Schütteln auf der Maschine in Wasser zu 0,3—0,5%. Die Pulver geben eine positive Reaktion nach GRANDEAU[3], die für Gitalin und Bigitalin charakteristisch ist. Der Keller-Kilianische Nachweis für Digitoxin fällt gleichfalls positiv aus. Man erhält einen braunroten Ring an der Grenze zwischen Eisessig und Schwefelsäure, während der Eisessig selbst allmählich eine indigoblaue Farbe annimmt. Zur Bestimmung der F. D. wurden entsprechende Mengen Substanz meist 13 mg in 50 ccm Wasser gelöst und nach dem amtlichen Verfahren an Fröschen austitriert. Wenn man bedenkt, daß je nach dem verwendeten Drogenmaterial die Endprodukte pro Gramm bis zu 250000 F. D. enthielten, also Werte erreichen, wie sie CLOETTA[4] für reines, praktisch wasserunlösliches Digitoxin angibt, so können die Beimengungen, die möglicherweise die Wasserlöslichkeit des Präparates bedingen, in nur sehr geringem Umfang vorhanden sein. Eine gesättigte, wäßrige Lösung eines hochaktiven Pulvers enthält bis zu 1400 F. D. pro Kubikzentimeter. In Tabelle 2 haben wir einige Versuche zusammengefaßt, die zeigen, daß die Ausbeute im Durchschnitt 74% der F. D.-Werte des Ausgangsmaterials beträgt. In der Mehrzahl der Versuche schwankt sie nur wenig um den Mittelwert. Berücksichtigt man, daß die biologische Auswertung eine nicht unerhebliche Streuungsbreite besitzt, und daß natürlich bei der chemischen Aufarbeitung der Droge gewisse Verluste unvermeidlich sind, so dürfen wir annehmen, daß jedenfalls der überwiegende Teil der Gesamtglykoside durch unser Verfahren abgetrennt worden ist.

Tabelle 2.

F.D.-Wert des verwendeten Blätterpulvers insgesamt	F.D.-Wert des gewonnenen Trockenpulvers insgesamt	Ausbeute an herzwirksamer Substanz in Prozent
19200	12000	62
38400	36200	94
48000	35300	74
48000	35600	74
1125000	890000	79
1125000	801200	71
3375000	2111500	63
	Durchschnitt:	74

Am isolierten Temporarienherzen sieht man bei einer Verdünnung des Präparates von 1 : 100000—200000 typische Digitaliswirkungen, wie Zunahme der Huhhöhe, Stillstand in Systole. Herzen, die unter Calciumentzug hypodynam schlagen, werden durch calciumfreie Nährlösungen, die das Präparat in einer Verdünnung von 1 : 100000—200000 enthalten, zu vollkommen normaler Arbeitsleistung zurückgeführt.

Die prozentuale Ausbeute an Trockensubstanz nach unserem Verfahren ist bei Anwendung verschiedener Blätterpulver ziemlich konstant, im Durchschnitt 0,7%, bezogen

auf Folia digitalis. Die Herzwirksamkeit der anfallenden Produkte aber hängt weitgehend von dem F. D.-Wert der Droge ab, d. h. man gewinnt um so wirksamere Präparate aus den Blättern, je mehr Froschdosen diese pro Gramm besitzen. Es verhalten sich — s. Tabelle 3 — z. B. die F. D.-Werte der beiden verwendeten Digitalisblätter pro Gramm wie 1 : 2,6, während die F. D.-Durchschnittswerte der daraus gewonnenen Trockenpulver pro Gramm sich wie 1 : 2,4 verhalten.

Tabelle 3.

F.D.-Zahl der verwendeten Digitalisblätter pro g	Ausbeute an Trockenpulver in Prozent des Ausgangsmaterials	F.D.-Zahl des erhaltenen Pulvers pro g
960	0,52	115000
960	0,71	100000
960	0,72	98000
	Durchschnitt:	104000
2500	0,72	274000
2500	0,69	257000
2500	0,73	214000
	Durchschnitt:	248000

Um weitere Anhaltspunkte zu gewinnen, ob die Glykosidmischung unseres Präparates dem der Blätter entspricht, haben wir die Kumulativwirkung der Droge und des Endproduktes untersucht. Denn es ist von ausschlaggebender Wichtigkeit für die klinische Wirkung eines Präparates, ob die Zahl von F. D. in Form einer schwach oder stark kumulierenden Substanz Herzkranken gegeben werden. Wir sehen in der Nichtberücksichtigung dieses Faktors bei der pharmakologischen Wertbestimmung der Digitalispräparate einen der Gründe dafür, daß die bisher geübte Titrierung sich für die Klinik als unzureichend erwiesen hat. Im Gegensatz zu HATSCHER[5], der zur Ermittelung der Kumulativwirkung an Katzen die sog. Auffülldosis bestimmt, haben wir zu den Versuchen Frösche verwendet.

Je 6 Frösche erhielten 75, 50, 36 und 20% der nach der zeitlosen Methode von HOUGTHON-STRAUB ermittelten Dosis letalis 6 Tage lang täglich subcutan in die Lymphsäcke. Als eine wirksame Kumulativdosis wurde diejenige angesehen, bei der von 6 Tieren mindestens 4 innerhalb einer Woche unter systolischem Herzstillstand zugrunde gingen. Ein Präparat besitzt Kumulativstärke I dann, wenn nach 75% D. l. die verlangte Zahl von Fröschen stirbt, bei niederen Dosen aber die Tiere überleben. Kumulativstärke II, III und IV gelten in entsprechender Weise für 50, 36 bzw. 20% D. l.

Tabelle 4 zeigt, daß der nach der amtlichen Vorschrift hergestellte Blätterextrakt am stärksten kumuliert, während drei, klinisch häufig verwendete Handelspräparate A, B und C viel weniger kumulierend wirksam waren. Beim Präparat A starben nach 36% der D. l. von 6 Fröschen noch 3 Tiere,

Seine Kumulativwirkung reichte fast an Stärke III heran. Hier handelte es sich um ein durch Dialyse gewonnenes Produkt aus Digitalis purpurea. Vergleicht man nun unser wasserlösliches Digitalispräparat mit Blätterpulver, so findet man denselben Grad der kumulierenden Wirkung wie für das Ausgangsmaterial, nämlich Stärke III. Dies ist für uns ein Grund mehr anzunehmen, daß durch unser Verfahren tatsächlich das Glykosidgemisch aus der Droge so extrahiert wird, wie es in den Blättern vorliegt (Tabelle 4).

Tabelle 4.

Präparat	F.D.-Zahl	Kumulativstärke
Digitalisblätterpulver vorläufiges nationales Standardpräparat*	pro g 2050	III
Wasserlösliches Trockenpulver, eigene Herstellung	pro mg 274	III
Handelspräparat A	pro ccm 143	II
Handelspräparat B	pro ccm 167	II
Handelspräparat C	pro ccm 200	I

Fromherz[6] hat bei der Eichung galenischer Auszüge der Folia digitalis purpurea an Fröschen und Katzen festgestellt, daß ein nahezu konstantes Verhältnis zwischen Katzendosen und Froschdosen besteht, und zwar entspricht im Mittel eine Katzendosis 156 Froschdosen. Daraus aber darf man nicht folgern, daß die Wertbestimmung eines Digitalispräparates am Frosch, wie sie in Deutschland üblich ist, der Eichung an der Katze, die von anderen Ländern bevorzugt wird, gleichzusetzen ist. Denn bei gereinigten Glykosiden — z. B. beim Gitalin oder Digitoxin — ist das Verhältnis ein anderes — 1 : 50—100. Wir haben nun ebenfalls wie Fromherz derartige Vergleichsuntersuchungen mit unserem Drogenmaterial und dem daraus gewonnenen Substanzgemisch ausgeführt und zur Eichung der Lösungen an der Katze das Verfahren von Wijngaarden[7] benutzt. Dabei konnten wir feststellen, daß bei einem nach der amtlichen Vorschrift hergestellten Blätterextrakt das Verhältnis einer Katzendosis zu Froschdosen wie 1 : 170 besteht. Diese Zahl deckt sich also mit der von Fromherz angegebenen.

Bei der Auswertung zweier nach unserem Verfahren hergestellter Digitalispräparate ergab sich zunächst, daß die Giftigkeit der Substanz am Frosch der an der Katze parallel geht.

Von 2 Präparaten, die pro Milligramm 274 bzw. 214 F. D. enthielten, waren zum Töten von 1 kg Katze im 1. Falle 2,68 mg, im 2. 3,05 mg erforderlich (Tabelle 5). Daraus berechnet sich ein Verhältnis von Katzendosis zu Froschdosen wie 1 : 700. In diesem Punkte also weicht unser Präparat von den Blättern grundlegend ab,

* Für die freundliche Überlassung des Blätterpulvers haben wir Herrn Geh. Rat Prof. ROST (Reichsgesundheitsamt Berlin) ergebenst zu danken.

und der Befund ist um so auffallender, als die Präparate einen sehr hohen Wirkungswert am Frosch aufwiesen — etwa 250000 F. D. pro Gramm.

Tabelle 5. Eichung an Katzen nach WIJNGAARDEN.

Präparat nach dem beschriebenen Verfahren hergestellt	F.D.-Zahl pro mg	1 kg Katze wird getötet durch mg Substanz	1 g Katzenherz wird systolisch stillgestellt durch mg Substanz (berechnet nach dem Versuch am ganzen Tier)
I	274	2,69	0,51
		2,68	0,49
		2,66	0,66
	Durchschnitt:	2,68	0,55
II	214	3,03	0,65
		3,02	0,75
		3,11	0,53
	Durchschnitt:	3,05	0,64

Zum Schluß haben wir noch einige Versuche durchgeführt, um einen Anhaltspunkt zu gewinnen, in welchem Umfange etwa unser Präparat vom Herzen ausgenutzt wird. WEESE[8] hat in einer Reihe von Arbeiten an Katzen gezeigt, daß 9 % von intravenös injiziertem Digitoxin durch das Herz aufgenommen werden, während der Rest von den übrigen Organen gebunden wird. Wir haben an isolierten Katzenherzen in der Versuchsanordnung von LOCKE und ROSENHEIM* diejenige Dosis ermittelt, die innerhalb von 30—60 Minuten zu einem systolischen Herzstillstand führt. Dabei darf man wohl, entsprechend den Untersuchungen von WEESE, annehmen, daß innerhalb dieser Zeit die Glykosidmenge aus der Nährlösung restlos vom Herzen absorbiert wird, um so mehr als kleinere Mengen das Herz für die Dauer von 2 Stunden nicht beeinflussen. Da die Herzen erst nach Beendigung des Versuches gewogen werden können, haben wir eine große Zahl von Versuchen durchgeführt und nur diejenigen berücksichtigt, bei denen das Herz innerhalb der angegebenen Zeit seine Tätigkeit einstellte.

Wir fanden bei einem Präparat, bei dem durch 0,55 mg Substanz am ganzen Tier 1 g Katzenherz getötet wurde, an isolierten Herzen folgende Zahlen — 1 g isoliert schlagendes Katzenherz (Locke-Rosenheimsche Versuchsanordnung) werden systolisch stillgestellt durch:

0,07 mg in 32 Minuten	0,07 mg in 45 Minuten
0,06 mg in 38 Minuten	0,07 mg in 60 Minuten.
0,07 mg in 38 Minuten	

Daraus ergibt sich, daß etwa 13 % der dem ganzen Tier intravenös zugeführten Glykosidmenge vom Herzen gebunden

* ABDERHALDEN, Handbuch der biochem. Arbeitsmethoden 3, 375. Berlin 1918. Nährflüssigkeit: 0,9 % NaCl, 0,042% KCl, 0,024% $CaCl_2$, 0,02% $NaHCO_3$, 0,1% Traubenzucker.

werden, ein Wert, der sich mit dem von WEESE an reinen Glykosiden ermittelten durchaus deckt.

Zusammenfassung: Durch eine Behandlung von Digitalisblättern mit Benzol, Extraktion mit Alkohol und weitere Reinigung mittels geeigneter Entmischungsverfahren gewinnt man wasserlösliche Glykosidgemische[9]*, die nach ihren chemischen und biologischen Eigenschaften der Glykosidverteilung in der Folia mit sehr großer Wahrscheinlichkeit entsprechen. Von diesem Präparat werden bei intravenöser Injektion etwa 13% vom Herzen gebunden.*

Literatur: [1] Arch. Pharmaz. **270**, 224 (1932). — [2] Rundschreiben des Reichsministeriums des Innern v. 21. XII. 1920; s. auch BEHRENS, GROS u. HILDEBRANDT, Arch. f. exper. Path. **167**, 365 (1932). — [3] Merk's Reagentien-Verzeichnis 3. Auflage 1913. — [4] Arch. f. exper. Path. **112**, 333 (1926). — [5] Arch. int. Med. **10**, 292 (1912). — [6] Arch. f. exper. Path. **165**, 407 (1932). — [7] Arch. f. exper. Path. **112**, 252 (1926); **113**, 40 (1926). — [8] Arch. f. exper. Path. **135**, 228 (1928); **141**, 329 (1929); **150**, 14 (1930). — [9] Das Präparat wird von der Goda A.-G., Breslau, hergestellt.

Sonderdruck aus Klinische Wochenschrift 1933, Nr. 48, S. 1862/1864.

Druck der Spamer A.-G. in Leipzig. — Printed in Germany.

Lebenslauf.

Am 4. Dezember 1909 wurde ich in Posen geboren. Von April 1916 bis Oktober 1919 besuchte ich dort das Lyzeum und trat im November 1919 in die Staatliche Augustaschule zu Breslau ein, an der ich im Februar 1929 die Reifeprüfung bestand. Im Sommer-Semester 1929 begann ich mit dem Studium der Zahnheilkunde in Breslau und legte nach 4 Semestern die zahnärztliche Vorprüfung ab. Im Dezember 1932 erhielt ich die Approbation als Zahnärztin.

Ich bin evangelisch und habe preußische Staatsangehörigkeit.

Johanna Becher.